

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-165332

(43)Date of publication of application : 24.06.1997

(51)Int.Cl.

A61K 31/19
 A61K 31/12
 A61K 31/215
 A61K 31/34
 A61K 31/44
 C07C 49/583
 C07C 65/40
 C07C 69/732
 C07C233/11
 // C07D213/79
 C07D307/32

(21)Application number : 07-351093

(71)Applicant : HOSOKAWA TOMOYOSHI

(22)Date of filing : 15.12.1995

(72)Inventor : MINAGAWA NOBUKO

YABU YOSHISADA

KITA KIYOSHI

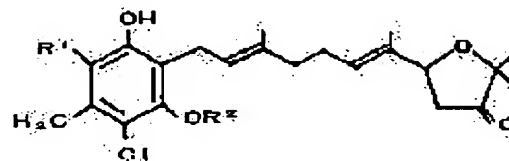
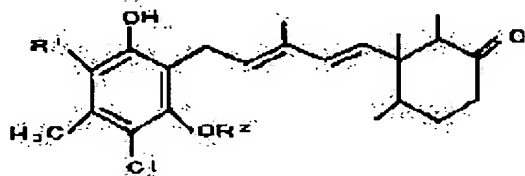
NAGAI KAZUO

HOSOKAWA TOMOYOSHI

(54) ANTIPROTOZOAL AGENT COMPRISING ISOPRENOID-BASED ANTIBIOTIC AS ACTIVE INGREDIENT**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antipprotozoal agent useful for preventing and treating African sleeping sickness and trypanosomiasis of a domestic animal caused by trypanosome as a pathogen, comprising a specific antibiotic or a prescribed compound having antitumor activity, etc., as active ingredient.

SOLUTION: This antipprotozoal agent comprises an isoprenoid-based ascochlorin of formula I [R₁ is CHO or COOH; R₂ is H or (C_nH_{2n})-R' [(n) is 1-5; R' is H, a group of the formula, COOR'' (R'' is H or a 1-3C alkyl) or COR''' (R''' is pyridyl, a 1-3C substituted amino, a phenylalkyl containing a halogen at its nucleus) replaced with any one of (n) carbon atoms]], its derivative, ascofuranone of formula II or its derivative as active ingredient. The compounds of formula I and formula II kill protozoan trypanosome with an extremely low concentration. A dosage of the medicine, for example, is 0.1-3mg per kg weight per day in the case of an injection, 10-1,000mg in the case of an oral administration and 1.0-2.0mg in the case of a suppository.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-165332

(43) 公開日 平成9年(1997)6月24日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/19	A E B		A 6 1 K 31/19	A E B
31/12	A F G		31/12	A F G
31/215			31/215	
31/34			31/34	
31/44			31/44	
審査請求 未請求 請求項の数 2 書面 (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-351093

(22) 出願日 平成7年(1995)12月15日

(71) 出願人 592174213

細川 知良

神奈川県横浜市港北区菊名6-10-18

(72) 発明者 皆川 伸子

新潟県新潟市寺尾上4丁目17番15号 ホン
ダマンション102号

(72) 発明者 蔵 義貞

愛知県春日井市東山町5丁目11番17号

(72) 発明者 北 潔

東京都豊島区目白4丁目20番2

(72) 発明者 永井 和夫

東京都豊島区池袋3丁目42番17号

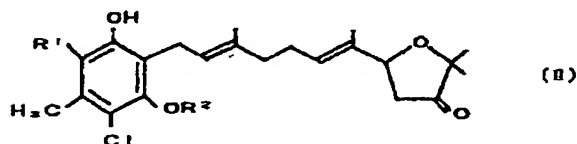
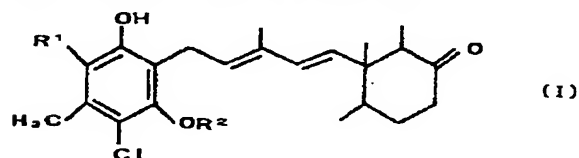
(72) 発明者 細川 知良

神奈川県横浜市港北区菊名6丁目10番18号

(54) 【発明の名称】 イソプレノイド系抗生物質を有効成分とする抗原虫剤

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 一般式 (I) もしくは一般式 (II) で示される化合物を有効成分とする抗原虫剤。



(式中、R¹ は-CHOまたは-COOHを表し、R² は水素原子、-(C_nH_{2n})-R' (nは1-5の整数、R' は水素原子またはn個の炭素原子のいずれか一つに置換されている基COOH等)、または-CO R' ' ' (R' ' ' はヒリジル基、炭素数1-3で置換されたアミノ基、核にハロゲン原子を有するフェノキシ

アルキル基又は核に炭素数1-3のアルコキシ基あるいは炭素数1-3のアルコシカルボニル基を有するフェニル基、を意味する)

【効果】 イソプレノイド系抗生物質アスコクロリン、アスコフラノンならびにそれらの誘導体はアフリカ睡眠病や家畜トリパノゾーマー病の予防・治療薬として極めて有効である。

(2)

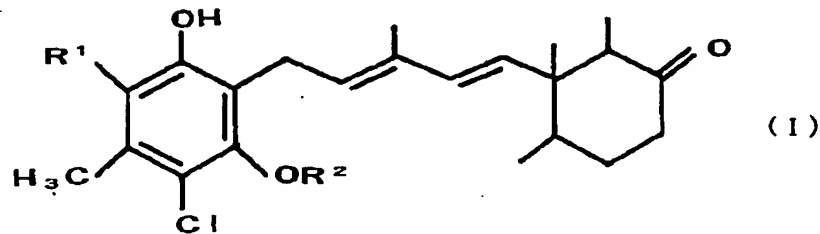
特開平9-165332

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 (I)

【化1】

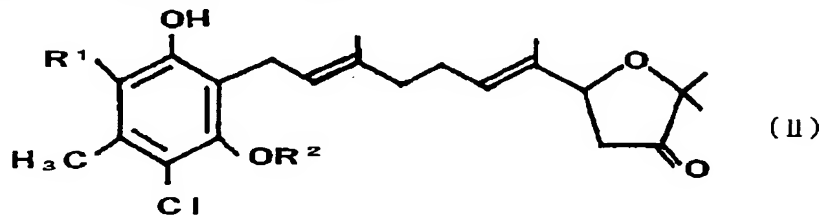


(式中、 R^1 は $-CHO$ または $-COOH$ を表し、 R^2 は水素原子、 $-(C_nH_{2n})-R'$ (n は1-5の整数、 R' は水素原子または n 個の炭素原子のいずれか一つに置換されている基 $COOR''$ 、ここでは R'' は水素原子または炭素数1-3のアルキル基を意味する) か、または $-COR'''$ (R''' はピリジル基、炭素数1-3で置換されたアミノ基、核にハロゲン原子を

有するフェノキシアルキル基又は核に炭素数1-3のアルコキシ基あるいは炭素数1-3のアルコキシカルボニル基を有するフェニル基を意味する) を有効成分とする抗原虫剤。

【請求項2】 一般式 (II)

【化2】



(式中、 R^1 は $-CHO$ または $-COOH$ を表し、 R^2 は水素原子、 $-(C_nH_{2n})-R'$ (n は1-5の整数、 R' は水素原子または n 個の炭素原子のいずれか一つに置換されている基 $COOR''$ 、ここでは R'' は水素原子または炭素数1-3のアルキル基を意味する) か、または $-COR'''$ (R''' はピリジル基、炭素数1-3で置換されたアミノ基、核にハロゲン原子を有するフェノキシアルキル基又は核に炭素数1-3のアルコキシ基あるいは炭素数1-3のアルコキシカルボニル基を有するフェニル基を意味する) を有効成分とする抗原虫剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】「産業上の利用分野」アフリカ睡眠病の病原体はトリパノゾーマ科に属する原虫ですべての脊椎動物(魚類、両棲類、鳥類、ほ乳類)の血液および組織に寄生し、媒介者としては無脊椎動物(昆虫、蛭)で、特に、ツェツェバエに刺されて感染することが多い。ツェツェバエに吸血されると局所でトリパノゾーマが分裂、増殖するため吸血された部位に硬結ができ、発赤と痛みを覚えるようになる。トリパノゾーマが脳脊髄液や中枢神経系の組織内に侵入するとなると、髄膜脳炎および脊髄炎の諸症状が現れるが、やがて嗜眠状態となり、ついに昏睡状態となる。治療しなければ、早晩、死の転帰をとり、自然治癒は望めない。

【0002】アフリカ睡眠病は *trypanosoma brucei gambiense*, *Trypano*

soma brucei rhodesiense を病原体とし、アフリカ大陸の赤道を中心に、南緯20度と北緯20度の間で広く発生しており、感染の危険のある人口は約3,500万人、年間新感染者数は1万人以上と推定されている。

【0003】家畜トリパノゾーマ病は *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* を病原体とし、馬、牛、豚、犬等の家畜類をはじめマウス、モルモット、ウサギ等を冒す伝染病である。特に馬の損失が最も大きくほとんど致死的で、貧血、浮腫、衰弱などを来し感染1カ月で斃死する。

【0004】[従来の技術] 上記一般式(I)で示される化合物のうち、 R^1 が CHO 、 R^2 が水素原子の化合物は本発明者等により発明されたアスコクロリンとして知られる化合物である。アスコクロリンは糸状菌 *Ascochyta visiae* の生産物より見いだされたイソプレノイド系抗生物質である(特許第585252号)。その誘導体に関しては製法ならびに血糖低下作用が特許第1556883号、ならびに特許第1643307号に記載されている。また、アスコクロリン誘導体のグリケイション阻害作用は特願平4-242051号に記載されている。

【0005】上記一般式(II)に示される化合物のうち、 R^1 が CHO 、 R^2 が水素原子の化合物は本発明者

(3)

特開平9-165332

等により発明されたアスコフラノンとして知られる化合物である。アスコフラノンは上記アスコクロリン製造時に糸状菌 *Ascochyta visiae* から生産され、その具体的製法は特公昭56-25310号公報に記載されており、その抗腫瘍活性はすでに特願昭55-162621、公開昭57-88119、特許公報63-61929に記載されている。また、アスコフラノン誘導体の血糖低下作用、血中脂質低下作用、グリケイション阻害作用、抗酸化作用は特願平6-506100号ならびに特開平7-206838号に記載されている。

【0006】[発明が解決しようとする課題] 本発明者等はイソプレノイド系抗生物質アスコクロリンとその誘導体ならびにアスコフラノンとその誘導体の呼吸阻害活性に着目し、医薬品としての新たな可能性を探るため鋭意研究を重ねてきた。その結果、ラット肝ならびに酵母 *Hansenula anomala* のミトコンドリアの呼吸に対して、アスコクロリンとその誘導体ならびにアスコフラノンとその誘導体が強い阻害作用を示すことが明らかになった。さらにアフリカ睡眠病の病原体である *Trypanosoma brucei brucei* 血流型原虫 (long slender form) の呼吸系に対する効果を検討した。同原虫のミトコンドリアの呼吸系はグリセロール-3-リン酸脱水素酵素と *Alternative Oxidase* の2種の酵素から構成されているが、この酵素系の役割はグリセロール-3-リン酸シャトルを介してNADHを酸化することによって解糖系を円滑に進行させることであるが、アスコフラノンはグリセロール-3-リン酸脱水素酵素を特異的かつ強力に阻害 ($I_{50} = 15.6 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白質) することが明らかになった。ミトコンドリアの呼吸が阻害されると嫌気的条件下と同様にグリセロールキナーゼの関与するグリセリン生成系によって解糖系の進行が維持される。従って、この経路を抑制するために最終生成物であるグリセリンを添加することによってグリセロール-3-リン酸

脱水素酵素や末端酸化酵素である *Alternative Oxidase* の阻害剤の致死作用が増大すると推定されるが、グリセリンの添加によってアスコフラノンの致死作用は著しく増大し15nMで完全致死作用を示した。この効果は現在、アフリカ睡眠病の治療薬として用いられているスラミンのほぼ47,000倍に相当する。

【0007】[課題を解決するための手段] 上記式

[I] [II] で示される化合物は原虫トリパノゾーマーを極めて低濃度で致死させることからトリパノゾーマーを病原体とするアフリカ睡眠病、家畜トリパノゾーマーの予防・治療薬として極めて有用である。

【0008】[投与方法] 本発明に係る各医薬品の用量は病態の種類、症状によって異なるが、例えば注射の場合は体重1kg1日当たり0.1-3mg、経口投与の場合は10-1000mg、座薬の場合には1.0-2.0mgで目的を達成することができる。本発明の化合物を薬剤として用いる場合は単独で用いても良いが、通常はアルカリで中和して水に溶解したり、懸濁剤、賦形剤又はその他の補助剤と混合して経口投与に適する剤形として製剤化することが望ましい。賦形剤または補助剤としては乳糖、種々の澱粉、ぶどう糖、シュウクロース、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸塩、タルク、植物油、レシチン等を用いて製造することが出来る。

[本発明を実施するための最良の形態] 以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、これは本発明をなんら限定するものではない。

【0009】[実施例-1] 酵母 *Hansenula anomala* のシアン感受性及びシアン耐性ミトコンドリアに対するアスコフラノン、アスコクロリン等の呼吸阻害効果を検討した。結果を表-1に示した。

【0010】

(4)

特開平9-165332

表-1

	I ₅₀ (μM)			
	15 mM Malate+	20 mM	15 mM	1 mM
	15 mM Pyruvate	エタノール	Succinate	NADH
	シアン感受性	シアン感受性	シアン感受性	シアン感受性
アスコフラノン	230	58	14.5	69
4-0-カルボキシメチル アスコフラノン	258	175	8.4	350
4-0-メトキシカルボニル メチルアスコフラノン	31.1	25.5	32.5	>2000
アスコクロリン	0.034	0.0084	0.036	0.043
4-0-メチル アスコクロリン	0.26	0.85	5.6	1.1
4-0-カルボキシメチル アスコクロリン	>200	>200	99.0	>200
4-0-ニコチノイル アスコクロリン	0.37	0.14	0.74	0.40
スラミン	170	20.8	65	3.5

	1 mM	20 mM	1 mM	1 mM
	NADPH	G-3-P	DQH ₂	DQH ₂
	シアン感受性	シアン感受性	シアン感受性	シアン耐性
	シアン感受性	シアン感受性	シアン感受性	シアン耐性
アスコフラノン	9.0	3.6	52	350
4-0-カルボキシメチル アスコフラノン	32.0	10.3		
4-0-メトキシカルボニル メチルアスコラノン	30.5	109		
アスコクロリン	0.027	0.024	0.021	0.038
4-0-メチル アスコクロリン	6.5	1.7	0.175	1.6
4-0-カルボキシメチル アスコクロリン	97.0	22.0	190	260
4-0-ニコチノイル アスコクロリン	0.45	0.54	0.078	0.23
スラミン	8.0	9.2	820	240

アスコクロリンは7種類の電子供与体に依存する活性すべてを強力に阻害し、Qサイクルのいずれかの部位を阻害することが明らかになった。アスコフラノンは、コハク酸、NADPH、グリセロール-3-リン酸を電子供与体とする活性を比較的強く阻害したが、その効果はアスコクロリンに比べて弱いものであった。また、Alternative oxidaseに対しても顕著な阻

害効果は示さなかった。

【0011】[実施例-2] ラット肝ミトコンドリアのコハク酸依存性の呼吸に対するアスコフラノン、アスコクロリン及びその誘導体の阻害効果を検討した。結果を表-2に示した。

【0012】

(5)

特開平9-165332

表-2

阻害剤	I 50
アスコフラノン	13 μ M
4-0-カルボキシメチル アスコフラノン	1.0 μ M
4-0-メトキシカルボニルメチル アスコフラノン	35 μ M
アスコクロリン	6.4 nM
4-0-メチル アスコクロリン	88 nM
4-0-カルボキシメチル アスコクロリン	4000 nM
4-0-ニコチノイル アスコクロリン	60 nM
アンチマイシン A ₃	11.5 nM
ミキソチアゾール	14 nM
スチグマテリン	16.3 nM

アスコロリンはQサイクルの阻害剤としてよく知られているアンチマイシンA₃、ミキソチアゾール、スチグマテリンよりも強い阻害を示したが、アスコフラノンには弱い阻害効果しか観察されなかった。

【0013】[実施例-3] ラット血流中で増殖させた
Trypanosoma brucei brucei
(ILTat 1.4) 虫体をグラスビーズで機械的に

破砕し、遠心分画法によってミトコンドリア画分を調製した。20 mM グルコース依存性の虫体の呼吸及びこのミトコンドリア標品における 20 mM グリセロール-3-リン酸依存性の呼吸に対するアスコフラノン、アスコクロリン及びそれらの誘導体の阻害効果を検討した。結果は表-3 に示した。

【0014】

表-3

	全細胞 ($\mu\text{mol}/10^7$ 細胞)	ミトコンドリア ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白)
アスコフラノン	0.87	25.0
4-0-カルボキシメチル アスコフラノン	2000	3140
4-0-メトキシカルボニルメチル アスコフラノン	48	643
アスコクロリン	5.0	89.7
4-0-メチル アスコクロリン	733	2770
4-0-カルボキシメチル アスコクロリン	15000	44800
4-0-ニコチノイル アスコクロリン	99.1	389
スラミン	2400	67300
ミキソチアゾール	328	21500
ステグマテリン	177	18600
アンチマイシンA ₂	1400	46600
TTFA	35400	1254000
没食子酸プロピル	313	7130

50%阻害 (I_{50}) の絶対量を比較すると、いずれの呼吸に対してもアスコフラノンが最も強力な阻害効果を示した。

【0015】[实施例-4] Trypanosoma
brucei brucei (GUTat 3.1) 血

流型原中を *in vitro* 培養系でアスコフラノン、アスコクロリン、スラミン、没食子酸プロピルを添加して 37℃、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養し、増殖阻害効果を検討した。結果を表-4 に示した。

【0016】

表-4

[illegible]

アスコクロリン	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
	0	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++
	5	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
	2.5	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++
スラミン	0	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
	10	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	5	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
没食子プロピル	10	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++
	5	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++
	2.5	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) 致死、(+) 数百個生存、(++) 数千-数万個生存、(+++) 50万個以上生存

スラミンは、アフリカ睡眠病の治療薬として現在、禁用されている。食品添加物として使用されている没食子プロピルは、Alternative oxidaseの特異的阻害剤としてよく知られている。ミトコンドリアの呼吸が阻害されると嫌気的条件下と同様にグリセロールキナーゼの関与するグリセリン生成系によって解糖系の進行が維持される。したがって、最終生産物であるグリセリンの添加によりこの経路が抑制されるために、ミ

トコンドリアの呼吸を特異的に阻害するアスコフラノン、アスコクロリン、没食子プロピルの増殖阻害効果が増大したものと考えられる。

【0017】[実施例-5] Trypanosoma brucei brucei (GUTat 3.1) 血流型原虫のin vitro培養系で、アスコフラノンの増殖阻害作用を検討した。結果を表-5に示した。

【0018】

表-5

グリセロール(%)	アスコフラノン (nM)									
	250000	125000	60000	30000	30	15	8	4	2	0
10	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
5	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
2.5	-	-	-	-	-	±	+	++	+++	+++
0	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) 致死、(+) 数百個生存、(++) 数千-数万個生存、(+++) 50万個以上生存

グリセリンの添加により、アスコフラノンは15 nMの低濃度で完全致死作用を示した。ミトコンドリアのグリセリン-3-リン酸脱水素酵素を特異的に阻害するアスコフラノンは、グリセリンの共存下において、きわめて強力な増殖阻害作用を発現することが明らかになった。

【0019】[発明の効果] イソプレノイド系抗生物質アスコクロリンとその誘導体ならびにアスコフラノンとその誘導体は原虫トリパノゾーマーを病原体とするアフリカ睡眠病や家畜トリパノゾーマー病の予防・治療薬として極めて有効である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 C 49/583		9049-4H	C 07 C 49/583	
65/40		2115-4H	65/40	
69/732			69/732	Z
233/11		9547-4H	233/11	
// C 07 D 213/79			C 07 D 213/79	
307/32			307/32	C